

⑦

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 03-219878

(43)Date of publication of application : 27.09.1991

(51)Int.Cl. C12N 15/31
 C12N 1/21
 C12N 15/52
 //(C12N 15/31
 C12R 1:02)
 (C12N 1/21
 C12R 1:02)
 (C12N 15/52
 C12R 1:02)

(21)Application number : 02-024395

(71)Applicant : NAKANO VINEGAR CO LTD

(22)Date of filing : 05.02.1990

(72)Inventor : FUKAYA MASAHIRO
 TAKEMURA HIROSHI
 TAYAMA KENJI
 OKUMURA HAJIME
 KAWAMURA KICHIYA

(30)Priority

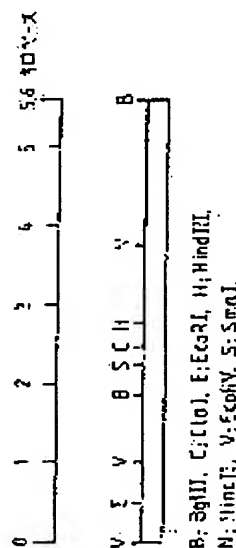
Priority number : 64 33776 Priority date : 15.02.1989 Priority country : JP

(54) ACETIC ACID-RESISTANT GENE, PLASMID CONTAINING THE SAME AND TRANSFORMED ACETOBACTER

(57)Abstract:

PURPOSE: To improve the resistance of microorganism to acetic acid and the efficiency of acetic fermentation by using an acetic acid-resistant gene originated from a microorganism of genus *Acetobacter* and having specific molecular size and restriction map.

CONSTITUTION: The objective acetic acid-resistant gene is originated from a microorganism of genus *Acetobacter* and has a molecular size of about 5.6 kilobase and a restriction map shown by the figure. Any microbial strain belonging to genus *Acetobacter* and exhibiting resistance to acetic acid can be used as the source for the acetic acid-resistant gene. The microorganism is e.g. *Acetobacter aceti* No.1023 or *Acetobacter aceti* IFO 3284. It is necessary for the manifestation of each gene to link a gene having promoter activity functioning in conventional host to each resistant gene in a manifestable state. The original promoter of the acetic acid-resistant gene, other gene having promoter activity and originated from *acetobacter* of an *E.coli* promoter manifestable in *acetobacter* can be used as the promoter for the manifestation of acetic acid-resistant gene in acetic bacteria of genus *Acetobacter* or *Gluconobacter*.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平3-219878

⑮ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成3年(1991)9月27日

C 12 N 15/31
1/21
15/52

ZNA.

7236-4B

※

審査請求 未請求 請求項の数 6 (全12頁)

⑭ 発明の名称 酢酸耐性遺伝子、それを含むプラスミド及び形質転換した酢酸菌

⑯ 特 願 平2-24395

⑰ 出 願 平2(1990)2月5日

優先権主張 ⑱ 平1(1989)2月15日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 平1-33776

⑳ 発 明 者	深 谷 正 裕	愛知県知多郡東浦町森岡字濁池1-28
㉑ 発 明 者	竹 村 浩	愛知県半田市荒古町2-11
㉒ 発 明 者	多 山 賢 二	愛知県半田市堀崎町2-17 コーポ野村半田2-201
㉓ 発 明 者	奥 村 一	愛知県半田市岩滑東町5丁目66-14
㉔ 発 明 者	川 村 吉 也	愛知県江南市古知野町古渡132
㉕ 出 願 人	株式会社中荳酢店	愛知県半田市中村町2丁目6番地
㉖ 代 理 人	弁理士 戸田 親男	

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

酢酸耐性遺伝子、それを含むプラスミド及び形質転換した酢酸菌

2. 特許請求の範囲

1. アセトバクター属の微生物に由来し、分子サイズが約5.6キロベースであり、制限酵素地図が第1図で示される酢酸耐性遺伝子。

2. アセトバクター属の微生物に由来し、分子サイズが約5.6キロベースであり、制限酵素地図が第1図で示される酢酸耐性遺伝子を含むプラスミド。

3. アセトバクター属の微生物に由来し、分子サイズが約5.6キロベースであり、制限酵素地図が第1図で示される酢酸耐性遺伝子を含むプラスミドによって形質転換した酢酸菌。

4. アセトバクター属の微生物に由来し、第5図、第6図及び第7図の塩基配列で示される酢酸耐性遺伝子。

5. アセトバクター属の微生物に由来し、第5

図、第6図及び第7図のアミノ酸配列で示される酢酸耐性遺伝子。

5. アセトバクター属の微生物に由来し、第5図のアミノ酸配列で示されるクエン酸合成酵素遺伝子。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、微生物の酢酸耐性に関与する遺伝子に関するものである。

本発明の酢酸耐性に関与する遺伝子を組入れたプラスミドを用いて形質転換することにより、微生物の酢酸耐性を向上させ、たとえば食酢製造における酢酸発酵を効率化することができるので、酢酸発酵界に益するところ大なるものがある。

〔従来技術および問題点〕

微生物の酢酸耐性を高める方法としては、自然界からのスクリーニングや種々の変異方法を使用して変異株を取得する方法などが、一般的におこなわれてきた。しかし、これらの方法で酢酸耐性を向上させた例としては、特開昭60-180581記載

のアセトバクター・アルトアセチゲネスと命名された新種の菌やエンザイム・マイクロブ・テクノロジー第9巻、第117頁(1987年)記載のクロストリジウム・サーモアセチカムの変異株の例などが知られているだけである。

これは、酢酸耐性の機構が解明されておらず、目的株の選択が酢酸濃度の高い培地で生育してくる菌を選択する方法しかなかったからである。

このため、目的株の取得は偶然性に期待するしかなく、多大な労力が必要であり、より効率的でしかも効果的な育種方法の出現が待たれていた。
(問題点を解決するための手段)

本発明者らは、上記事情にかんがみ、計画的に酢酸耐性を向上させるためには、酢酸耐性を担う遺伝子を用いて組み換えDNA技術により、育種することが最も有効であると考え、鋭意検討をおこない、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、アセトバクター属の微生物に由来し、分子サイズが約5.6キロベースであり、制限酵素地図が第1図で示される酢酸耐性遺伝子

で切断し、適当なベクターと連結した後、アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー第49巻、第2091頁(1985年)記載の方法で形質転換するか、ジャーナル・オブ・バクテリオロジー、第165巻、第336頁(1986年)記載のpRK 2013などの伝達性プラスミドを用いて接合伝達法により酢酸耐性の低下した変異株を形質転換する。形質転換株のうち、宿主より酢酸耐性が向上したものを選択することにより、該遺伝子をもつ株を得ることができる。

全DNAの調製は、アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー、第49巻、第1011頁(1985年)記載の方法など通常の方法にしたがえばよい。また使用するベクターとしては、アセトバクター属で安定に保持されるものであれば特に限定はない。たとえば、特開昭60-9488に開示されているpTA 5011、pTA 5012や広宿主域ベクターpRK 2013、RP 4などが使用できる。

形質転換する酢酸菌は、アセトバクター属又はグルコノバクター属に属する微生物であればよく、

特開平3-219878(2)

又はこれを含むプラスミド又は該プラスミドによって形質転換した酢酸菌に関するものである。

本発明における酢酸耐性遺伝子源は、アセトバクター属の微生物で酢酸耐性を示す菌株であれば、特に限定はない。たとえば、アセトバクター・アセチNo1023(FERM BP-2287)やアセトバクター・アセチIFO 3284などが挙げられる。

遺伝子分離は、種々の方法で分離可能であるが、たとえばアセトバクター属の酢酸耐性が低下した変異株を用い、導入した遺伝子により、低下した酢酸耐性が、向上することを指標としておこなう方法が用いられる。酢酸耐性の低下した変異株の取得は、たとえばアグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー第46巻、第381頁、1982年に記載の自然変異を利用する方法やN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンを変異源として用いる方法などでおこなうことができる。

酢酸耐性の低下した変異株を宿主として、酢酸耐性の低下していない親株あるいは高濃度酢酸耐性株から抽出精製した全DNAを適当な制限酵素

特に限定はない。

また、酢酸菌の形質転換方法としては、たとえば、アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー、第49巻、第2091頁、第2407頁(1985年)記載の方法などが使用できる。

得られた遺伝子の塩基配列の決定は、常法に従えばよく、たとえばM13ファージを用いたジデオキシ法で決定すればよい。実施例に示したごとく、酢酸耐性遺伝子は、塩基配列の結果から3種類の遺伝子から構成されている。各遺伝子の塩基配列および塩基配列にもとづいて決定されたアミノ酸配列を第5図、第6図及び第7図に示した。これら3つの遺伝子単独では、酢酸耐性を付与することができず、3つの遺伝子が同時に発現し、機能することが必要である。

各遺伝子の発現には、通常宿主内で機能するプロモーター活性をもつ遺伝子と各耐性遺伝子とを発現可能な形で連結する必要がある。アセトバクター属やグルコノバクター属の酢酸菌で酢酸耐性遺伝子を発現させるために用いるプロモーターと

しては、酢酸耐性遺伝子本来のプロモーターも使用できるし、酢酸菌由来の他のプロモーター活性をもつ遺伝子や酢酸菌で発現可能な大腸菌のプロモーターも使用できる。

大腸菌プロモーターとしては、大腸菌プラスミド pBR 322 のアンピシリン耐性遺伝子や大腸菌プラスミド pACYC 177 のカナマイシン耐性遺伝子、大腸菌プラスミド pACYC 184 のクロラムフェニコール耐性遺伝子、大腸菌の β -ガラクトシダーゼ遺伝子のプロモーターなどが使用できる。

プロモーター活性をもつ遺伝子は、各耐性遺伝子が宿主に悪影響を及ぼさないように、適当量に発現量を制御するため、おのおのの遺伝子で使用するプロモーター活性をもつ遺伝子をかえてもよい。過剰量に酢酸耐性遺伝子が発現し、宿主の生育等に影響を及ぼす場合には、上記のような適当なプロモーターを選択したり、ベクターを選択し、コピー数を変化させ、発現量を制御する必要がある。後者の場合には、各遺伝子をそれぞれ別のベクターに組みこみ、ベクターのコピー数の違いを

が3%以上であるのに対し、10-80の耐性は1%以下であった。親株であるアセトバクター・アセチノ1023の全DNAをアグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー第49巻、第1011頁(1985年)の方法で調製した。全DNAを制限酵素Eco RIで切断後、特開昭60-9488に開示されたベクターpTA 5011をEco RIで切断し、T4 DNAリガーゼを用いて両者を連結した。連結反応物をアグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー、第49巻、第2091頁(1985年)の方法にしたがって形質転換した。形質転換株は、ベクター上のアンピシリン耐性遺伝子を指標とし、YPG寒天培地(グルコース3%、酵母エキス0.5%、ポリペプトン0.2%、寒天2%、pH6.5)にアンピシリン(50 μ g/ml)を加えた培地で選択した。得られた約5,000株のアンピシリン耐性の形質転換株について、YPG寒天培地に種々の濃度の酢酸を加え、レプリカ法で、酢酸耐性を調べた。宿主の10-80の酢酸耐性が1%であるのに対し、得られた形質転換株の1株のみが3%の酢酸を含む培地で

特開平3-219878(3)

利用して、発現量を制御することもできる。

また、酢酸菌内に酢酸耐性遺伝子を含む遺伝子断片を保持させるためのベクターとしては、たとえば、特開昭60-9488に開示されているpTA 5001(A)、pTA 5001(B)や酢酸菌に導入可能な広宿主域ベクターRP 4::Mu、RP 4、pRK 2013、RSF 1010などが利用できる。

なお、もともと酢酸耐性遺伝子の一部を有している宿主に酢酸耐性を付与する場合には、保有していない遺伝子のみを宿主に形質転換すればよい。また、酢酸耐性遺伝子を3つとも有している宿主の場合でも、特定の遺伝子の発現量が低く、酢酸耐性が低い場合には、必要な遺伝子を導入し、発現量を高める必要がある。

〔実施例〕

アセトバクター・アセチノ1023(FERN BP-2287)から、アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー、第46巻、第381頁(1982年)記載の自然変異の方法により、酢酸耐性の低下した変異株10-80を得た。親株のNo1023の酢酸耐性

生育した。この株のプラスミドをアグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー、第49巻、第2083頁(1985年)の方法で調べたところ、ベクター以外に約7.5キロベースの遺伝子断片を含んでいた。また、上記方法とは、用いる制限酵素がBgl IIである以外は同じ方法で10-80に酢酸耐性を付与するプラスミドを単離した。約5,000株から4株のプラスミドを単離したが、いずれも、ベクター以外に約6.5キロベースの遺伝子をもっており、常法により制限酵素地図を作成したところ、4株とも同一の遺伝子断片であることが分かった。Eco RIを用いて単離した遺伝子の制限酵素地図を第2図に、またBgl IIを用いて単離した遺伝子の制限酵素地図を第3図に示す。第2図、第3図から明らかなように、Eco RIで単離した遺伝子Bgl IIで単離した遺伝子は、共通部分を有していた。

(酢酸性に関与する遺伝子領域の決定)

上記方法で単離した遺伝子のどの領域に酢酸耐性に関与する遺伝子が存在しているかを調べるた

特開平3-219878(4)

めに以下の大腸菌ベクター由来のカナマイシン耐性遺伝子を用いた挿入失活実験をおこなった。

第2図に示す Eco RI断片を大腸菌ベクターpUC 18のEco RI部位に常法によりクローン化した。

このキメラプラスミドをCla Iで切断した。pUC 18は、Cla Iで切断されないため、Eco RI断片上に1ヶ所あるCla I部位で唯1ヶ所切断される。一方、大腸菌ベクターpACYC 177(ジャーナル・オブ・バクテリオロジー、第134巻、第1141頁(1978年) ATCC 37031として寄託されている。)をベクター上のカナマイシン耐性遺伝子を切断しないように制限酵素Hae IIで切断した。Cla Iで切断したキメラプラスミドおよびHae IIで切断したpACYC 177を常法にしたがいT4 DNAポリメラーゼ処理し、切断末端を平滑化した。平滑化した後、常法にしたがいT4 DNAリガーゼを用いて両者を連結した。連結物を常法にしたがい、大腸菌宿主 E.coli JM 109に形質転換した。形質転換株は、LB培地("A Manual for Genetic Engineering"第201頁、Cold Spring Harbor Laboratory, 1980年)にアンピシ

リン30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及びカナマイシン30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む寒天培地(寒天濃度1.5%)で選択した。得られた形質転換株のプラスミドをBirnboimとDolyの方法(Nucleic Acids Res., 第7巻、第1513頁、1979年)にしたがい調べ、分子サイズ及び制限酵素解析からpUC 18、Eco RI断片およびpACYC 177のカナマイシン耐性遺伝子を含む遺伝子断片の3者のキメラプラスミドを得た。ここで得られたキメラプラスミドは、pUC 18のEco RI部位に第2図で示される酢酸耐性遺伝子部分が組みこまれ、さらに組みこまれた酢酸耐性遺伝子部分のCla I部位にpACYC 177由来のカナマイシン耐性遺伝子が組みこまれた構造となっている。この組み換えプラスミドをアグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー、第49巻、第2091頁(1985年)記載の方法で、アセトバクター・アセチル1023に形質転換した。形質転換株は、上記 YPG寒天培地にカナマイシン100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で加えた培地で選択した。形質転換に用いたベクターは、大腸菌ベクターであり、大腸菌で複製するのに必要な機能は有

しているが、アセトバクター属では複製できない。このため、得られたカナマイシン耐性の形質転換株は、アセトバクター属の宿主の染色体ないしはプラスミドDNA上の相同部位と組み換えをおこし、宿主染色体またはプラスミドにカナマイシン耐性遺伝子が組みこまれている。この場合、カナマイシン耐性遺伝子の組みこまれている部位が、酢酸耐性に関与しているならば、カナマイシン耐性遺伝子の挿入により、酢酸耐性遺伝子が不活性化される。このため、得られるカナマイシン耐性の形質転換株は、カナマイシン耐性の獲得と同様に酢酸耐性が低下する。第2図に示される遺伝子のCla I部位にカナマイシン耐性遺伝子を挿入したプラスミドを用いて得られたカナマイシン耐性の形質転換株の酢酸耐性を上記した YPG寒天培地に種々の濃度の酢酸を加えて調べたところ、No 1023株の耐性が3%以上であったのに対し、形質転換株では1%以下に顕著に低下していた。このことから、Cla I部位が、酢酸耐性に関与する遺伝子内にあることが分かった。同様の手法にて、

第2図、第3図の各遺伝子上の制限酵素切断部位にカナマイシン耐性遺伝子を組みこんだ組み換えプラスミドを作成し、No 1023に上記と同様にして形質転換した。(第4図にカナマイシン耐性遺伝子の挿入位置を示した。)得られたカナマイシン耐性の形質転換株の酢酸耐性を調べたところ、第1表に示すごとくになった。

第1表

カナマイシン耐性遺伝子の挿入位置	1	2	3	4	5	6	7
得られたカナマイシン耐性形質転換株の酢酸耐性	>3%	>3%	<1%	<1%	<1%	>3%	>3%

これらの結果から、第1図に制限酵素地図を示す遺伝子部位が、酢酸耐性に関与する遺伝子領域であると決定した。第1図に示す遺伝子は、第4図のPst Iで切断される約7.6キロベースの遺伝子断片に含まれる形でpUC 18をベクターとしてE.coli JM 109に形質転換され、E.coli AR-1の株名で、FERM P-10512として農工研に寄託されてい

る。

(酢酸菌耐性遺伝子を含む遺伝子断片の酢酸菌宿主への形質転換)

上記実施例で単離した第4図に制限酵素地図を示す遺伝子断片をPst Iで切断して得られる約7.6キロベースの遺伝子断片を大腸菌ベクターpUC 18に組込んだ組み換えプラスミドをE.coli AR-1から常法により単離した。

次に、アセトバクター・アセチ・ザブスピーシズ・キシリナムIFO 3288の有するプラスミドのうち、分子サイズが約2.1キロベースのプラスミドを常法により単離し、制限酵素Acc Iで切断した後、T4 DNAポリメラーゼで切断末端を平滑化した。一方、E.coli AR-1から単離したpUC 18のPst I部位に第4図に示される遺伝子断片をPst Iで切断して得られる約7.6キロベースの遺伝子断片を組みこんだ組換えプラスミドを制限酵素Sal Iで切断し、同じくT4 DNAポリメラーゼで切断末端を平滑化した。

両者をT4 DNAリガーゼにより連結し、組み換

上記で得られた形質転換株の酢酸耐性を元株と比較した。YPG液体培地(上記のYPG寒天培地から寒天を除いた組成の培地)に種々の濃度の酢酸を加えて、30℃で4日間振とう培養し、生育の有無について調べた。

元株では酢酸濃度1.5%(v/v)までしか生育が見られなかったが、形質転換株では、酢酸濃度2.5%(v/v)の培地でも生育が見られ、酢酸耐性遺伝子を含むプラスミドで形質転換することにより、酢酸菌の酢酸耐性を向上させることができた。

(酢酸耐性遺伝子の塩基配列の決定)

実施例で得た大腸菌形質転換株E.coli AR-1の保有するプラスミドを常法によって精製し、得られた精製DNAをPst Iで切断して得られる約7.6キロベースの遺伝子断片についてM13ファージを用いたジデオキシ法(Methods in Enzymology, 第10巻, 第20頁, Academic Press, New York, 1983年)によってその塩基配列を決定した。

決定した塩基配列をもとに翻訳可能領域を検索した。カナマイシン耐性遺伝子を用いた挿入失活

特開平3-219878(5)

え体を得た後、アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー第49巻、第2465頁(1985年)に開示された方法により、アセトバクター・アセチ・ザブスピーシズ・キシリナム IFO 3288に形質転換した。形質転換株はアンピシリン300 µg/mlを含むYPG寒天培地(グルコース3%、酵母エキス0.5%、ポリペプトン0.2%、寒天2%、pH6.5)で選択した。選択培地に生育したアンピシリン耐性株のプラスミドをアグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー、第49巻、第2083頁(1985年)の方法に準じて調べた。形質転換株は元株と比較し、導入したプラスミドと同一サイズの約12.4キロベースのプラスミドを余分に保有しており、また、制限酵素解析により、pUC 18および第4図に示される遺伝子断片をPst Iで切断して得られる約7.6キロベースの遺伝子断片およびアセトバクター・アセチ・ザブスピーシズ・キシリナム IFO 3288の保有する約2.1キロベースの大きさのプラスミドの3者のキメラプラスミドであることを確認した。

実験により、カナマイシン耐性遺伝子の挿入により酢酸耐性の低下した制限酵素サイト(第4図の3、4、5)が領域内にあるような翻訳可能領域を検索したところ、第5図、第6図、第7図に示すようなATG翻訳開始コドンから翻訳されるそれぞれ1308塩基、462塩基、1224塩基からなるアミノ酸残基436、154、408(分子量48120、17510、44490)をコードする領域が見出された。(第5図、第6図、第7図の塩基配列から決定されたアミノ酸配列を第5図、第6図、第7図の塩基配列の下段に示した。)第5図、第6図、第7図の塩基配列で示されるポリペプチドが酢酸耐性の発現に関与していることは、以下のようにして確認した。第5図に塩基配列を示した遺伝子(以下aarAと命名)内にあるHinc IIサイト(塩基数655)で切断し、アミノ末端側とカルボキシ末端側を含む断片をそれぞれ調製し、翻訳フレームが合うように大腸菌発現ベクターpUC 18またはpUC 19のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子のアミノ末端部分にあるポリリンカー部分の制限酵素サイトにT4 DNAリガーゼを用

い連結し、大腸菌宿主 *E. coli* JM 109 に常法により形質転換した。得られた組換えプラスミドを保有する形質転換株をアンピシリン $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 β -インプロピルガラクトチオグルコサイド (IPTG) 1 mM を含む LB 液体培地で 37°C 、18 時間培養し、得られた菌体を 0.01 M リン酸バッファー ($\text{pH} 7.0$) で洗浄後、超音波破砕をおこない、得られた菌体破砕液を常法によりドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、クマシーブリリアントブルーで蛋白染色した。IPTG により *lac* プロモーターを誘導した場合、カルボキシ末端側を含む断片を β -ガラクトシダーゼ遺伝子の下流側に連結した組換えプラスミドでは、分子量約 $28,000$ の蛋白が著量合成されたが、アミノ末端側を含む断片を β -ガラクトシダーゼ遺伝子の下流に第 5 図とは逆向きに連結した組換えプラスミドでは、特異的な蛋白の合成は見られなかった。このことから、第 5 図の翻訳可能領域が存在することが確認された。第 6 図および第 7 図に塩基配列を示した遺伝子 (それぞれ *aarB*、*aarC* と命名)

入位置 4 の *Hind* III サイトから挿入位置 6 の *Bgl* II サイトの間の断片) を大腸菌ベクター pUC 19 に T4 DNA リガーゼを用い、連結し、常法により組換えプラスミドを得た。このプラスミドを大腸菌のクエン酸合成酵素欠損株 *E. coli* ME 8330 (国立遺伝学研究所に保存されている。) に常法により形質転換し、形質転換株を得た。元株と形質転換株のクエン酸合成酵素活性を *Methods in Enzymology*, 第 13 巻, 第 3 頁 (1969) の方法にしたがって測定したところ、元株の比活性が $0.01 \text{ ユニット}/\text{mg}$ 蛋白以下であったのに対し、形質転換株では、 $4.5 \text{ ユニット}/\text{mg}$ 蛋白であり、顕著な活性の発現がみられた。また、先の実施例で得られた、第 4 図でカナマイシン耐性遺伝子の挿入位置の 5 にカナマイシン耐性遺伝子が挿入され *aarA* 遺伝子が欠損していると推定されるカナマイシン耐性の形質転換株のクエン酸合成酵素活性を上記の方法に準じて測定したところ、親株の比活性が $0.39 \text{ ユニット}/\text{mg}$ 蛋白であるのに対し、形質転換株では $0.01 \text{ ユニット}/\text{mg}$ 蛋白以下の比活性しかなく、クエン酸合

特開平 3-219878 (6)

について、*aarB* については、*aarB* の上流にある *Nde* I サイトで、*aarC* については、*aarC* 内にある *Eco* RI サイト (塩基数 825) で *aarA* と同様に融合蛋白として発現させられたことから (*Nde* I サイトでは分子量 $17,000$ の蛋白が、また *Eco* RI サイトでは分子量 $15,000$ の蛋白が生産された。)、各々の翻訳可能領域が存在することを確認した。各遺伝子の翻訳開始位置は、酢酸菌と同じグラム陰性菌である大腸菌の SD 配列との類似性をもとに決定した。

(*aarA* 遺伝子の機能)

第 5 図に塩基配列を示した *aarA* 遺伝子の機能を明らかにするため、既知遺伝子とのホモロジー検索をおこなった。アミノ酸配列をもとにして比較したところ大腸菌、シュードモナス、リケッチアのクエン酸合成酵素と 50% 以上のホモロジーが見出された。*aarA* 遺伝子がクエン酸合成酵素の遺伝子であるかは以下のようにして確認した。

aarA 遺伝子を含む約 2.9 キロベース の *Hind* III - *Bgl* II 断片 (第 4 図のカナマイシン耐性遺伝子の挿

成酵素が欠失していることが確認できた。次に、上記の第 4 図で制限酵素地図を示した断片の内、*aarA* 遺伝子を含む *Hind* III - *Bgl* II 断片が組みこまれた pUC 19 を *Eco* RI で切断し、T4 DNA ポリメラーゼで平滑化し、一方、アセトバクター・アセチ・サブスピーシズ・キシリナム IF0 3288 の有するプラスミドのうち、分子サイズが約 2.1 キロベース のプラスミドを常法により単離し、制限酵素 *Acc* I で切断した後、T4 DNA ポリメラーゼで切断末端を平滑化したプラスミド DNA を T4 DNA リガーゼを用い連結し、組換えプラスミドを作成した。この組換えプラスミドは、*aarA* 遺伝子を含む *Hind* III - *Bgl* II 断片と大腸菌ベクター pUC 19 とアセトバクターのプラスミドとの 3 者のキメラプラスミドである。このキメラプラスミドをアグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー 第 49 巻, 第 2485 頁 (1985 年) に開示された方法により、アセトバクター・アセチ・サブスピーシズ・キシリナム IF0 3288 に形質転換した。形質転換株はアンピシリン $300 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含む YPG 寒天培

地(グルコース3%、酵母エキス0.5%、ポリペプトン0.2%、寒天2%、pH6.5)で選択した。選択培地に生育したアンピシリン耐性株のプラスミドをアグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー、第49巻、第2083頁(1985年)の方法に準じて調べ制限酵素解析により、pUC 19および第4図に示される遺伝子断片を HindIII と BglII で切断して得られる約 2.9キロベースの遺伝子断片およびアセトバクター・アセチ・サブスピーシズ・キシリナム IF0 3288 の保有する約2.1キロベースの大きさのプラスミドの3者のキメラプラスミドを保有していることを確認した。

上記で得られたアンピシリン耐性の形質転換株のクエン酸合成酵素の活性を、上記と同様な方法で測定したところ、4.5ユニット/mg蛋白であり、*accA* 遺伝子を有するプラスミドの導入により、活性が回復しただけでなく、コピー数にもとづく遺伝子増幅効果により、親株の10倍以上にまで活性が上昇した。

〔発明の効果〕

Gln グルタミン	Glu グルタミン酸
Gly グリシン	His ヒスチジン
Ile イソロイシン	Leu ロイシン
Lys リシン	Phe フェニルアラニン
Pro プロリン	Ser セリン
Thr スレオニン	Trp トリプトファン
Tyr チロシン	Val バリン

代理人 弁理士 戸田 親 男

特開平3-219878(7)

本発明を用いれば、従来、偶然性によってしか得ることのできなかった酢酸耐性の向上した菌株を容易に取得することができるだけでなく、酢酸耐性の向上した酢酸菌を用いることにより、酢酸発酵の効率化が可能となる。

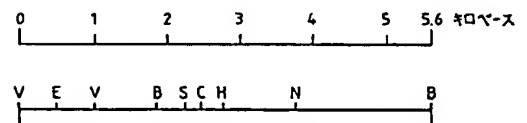
4. 図面の簡単な説明

第1図は、酢酸耐性遺伝子の制限酵素地図で、第2図は、Eco RIを用いて単離した酢酸耐性遺伝子の制限酵素地図で、第3図は、Bgl IIを用いて単離した酢酸耐性遺伝子の制限酵素地図で、第4図は、カナマイシン耐性遺伝子の挿入位置を示す。第5図、第6図及び第7図は、連続させて酢酸耐性遺伝子の塩基配列及びアミノ酸配列を示す。第5図は単独でクエン酸合成酵素遺伝子の塩基配列及びアミノ酸配列を示す。

アミノ酸配列における略記号の意味は次のとおりである。

Met メチオニン	Ala アラニン
Arg アルギニン	Asn アスパラギン
Asp アスパラギン酸	Cys システイン

第 1 図

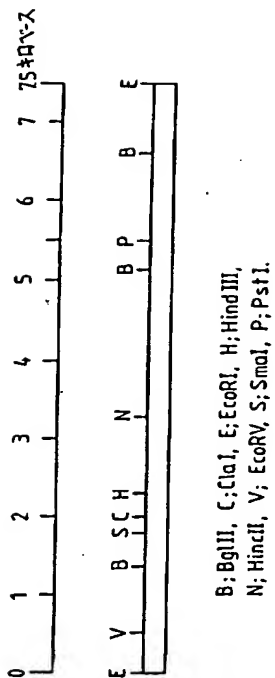


B; BglII, C; ClaI, E; EcoRI, H; HindIII, N; HincII, V; EcoRV, S; SmaI.

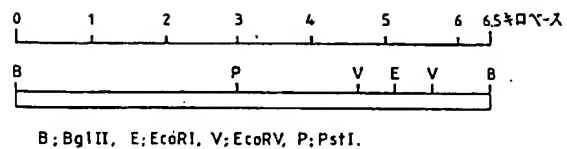
(8)

特開平3-219878(8)

第 2 図

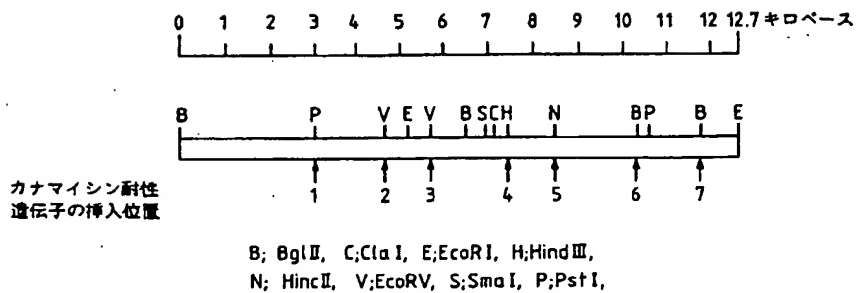


第 3 図



図面の浄書(内容に変更なし)

第 4 図



CCGTCTCTGGCCGCGCCATGACACCGGATCTGATCTGCATCCGCGATCGATGACGACGAGAT
 ProfaLLeuAlaargrAlaalekhungrAlcLewlIdelculliabAlaapillIdelGIdulAn
 720 740 760 780 800 820 840 860 880 900 920 940 960 980 1000 1020 1040 1060 1080 1100 1120 1140 1160 1180 1200 1220 1240 1260 1280 1300 1320 1340 1360 1380 1400 1420 1440 1460 1480 1500 1520 1540 1560 1580 1600 1620 1640 1660 1680 1700 1720 1740 1760 1780 1800 1820 1840 1860 1880 1900 1920 1940 1960 1980 2000 2020 2040 2060 2080 2100 2120 2140 2160 2180 2200 2220 2240 2260 2280 2300 2320 2340 2360 2380 2400 2420 2440 2460 2480 2500 2520 2540 2560 2580 2600 2620 2640 2660 2680 2700 2720 2740 2760 2780 2800 2820 2840 2860 2880 2900 2920 2940 2960 2980 3000 3020 3040 3060 3080 3100 3120 3140 3160 3180 3200 3220 3240 3260 3280 3300 3320 3340 3360 3380 3400 3420 3440 3460 3480 3500 3520 3540 3560 3580 3600 3620 3640 3660 3680 3700 3720 3740 3760 3780 3800 3820 3840 3860 3880 3900 3920 3940 3960 3980 4000 4020 4040 4060 4080 4100 4120 4140 4160 4180 4200 4220 4240 4260 4280 4300 4320 4340 4360 4380 4400 4420 4440 4460 4480 4500 4520 4540 4560 4580 4600 4620 4640 4660 4680 4700 4720 4740 4760 4780 4800 4820 4840 4860 4880 4900 4920 4940 4960 4980 5000 5020 5040 5060 5080 5100 5120 5140 5160 5180 5200 5220 5240 5260 5280 5300 5320 5340 5360 5380 5400 5420 5440 5460 5480 5500 5520 5540 5560 5580 5600 5620 5640 5660 5680 5700 5720 5740 5760 5780 5800 5820 5840 5860 5880 5900 5920 5940 5960 5980 6000 6020 6040 6060 6080 6100 6120 6140 6160 6180 6200 6220 6240 6260 6280 6300 6320 6340 6360 6380 6400 6420 6440 6460 6480 6500 6520 6540 6560 6580 6600 6620 6640 6660 6680 6700 6720 6740 6760 6780 6800 6820 6840 6860 6880 6900 6920 6940 6960 6980 7000 7020 7040 7060 7080 7100 7120 7140 7160 7180 7200 7220 7240 7260 7280 7300 7320 7340 7360 7380 7400 7420 7440 7460 7480 7500 7520 7540 7560 7580 7600 7620 7640 7660 7680 7700 7720 7740 7760 7780 7800 7820 7840 7860 7880 7900 7920 7940 7960 7980 8000 8020 8040 8060 8080 8100 8120 8140 8160 8180 8200 8220 8240 8260 8280 8300 8320 8340 8360 8380 8400 8420 8440 8460 8480 8500 8520 8540 8560 8580 8600 8620 8640 8660 8680 8700 8720 8740 8760 8780 8800 8820 8840 8860 8880 8900 8920 8940 8960 8980 9000 9020 9040 9060 9080 9100 9120 9140 9160 9180 9200 9220 9240 9260 9280 9300 9320 9340 9360 9380 9400 9420 9440 9460 9480 9500 9520 9540 9560 9580 9600 9620 9640 9660 9680 9700 9720 9740 9760 9780 9800 9820 9840 9860 9880 9900 9920 9940 9960 9980 10000 10020 10040 10060 10080 10100 10120 10140 10160 10180 10200 10220 10240 10260 10280 10300 10320 10340 10360 10380 10400 10420 10440 10460 10480 10500 10520 10540 10560 10580 10600 10620 10640 10660 10680 10700 10720 10740 10760 10780 10800 10820 10840 10860 10880 10900 10920 10940 10960 10980 11000 11020 11040 11060 11080 11100 11120 11140 11160 11180 11200 11220 11240 11260 11280 11300 11320 11340 11360 11380 11400 11420 11440 11460 11480 11500 11520 11540 11560 11580 11600 11620 11640 11660 11680 11700 11720 11740 11760 11780 11800 11820 11840 11860 11880 11900 11920 11940 11960 11980 12000 12020 12040 12060 12080 12100 12120 12140 12160 12180 12200 12220 12240 12260 12280 12300 12320 12340 12360 12380 12400 12420 12440 12460 12480 12500 12520 12540 12560 12580 12600 12620 12640 12660 12680 12700 12720 12740 12760 12780 12800 12820 12840 12860 12880 12900 12920 12940 12960 12980 13000 13020 13040 13060 13080 13100 13120 13140 13160 13180 13200 13220 13240 13260 13280 13300 13320 13340 13360 13380 13400 13420 13440 13460 13480 13500 13520 13540 13560 13580 13600 13620 13640 13660 13680 13700 13720 13740 13760 13780 13800 13820 13840 13860 13880 13900 13920 13940 13960 13980 14000 14020 14040 14060 14080 14100 14120 14140 14160 14180 14200 14220 14240 14260 14280 14300 14320 14340 14360 14380 14400 14420 14440 14460 14480 14500 14520 14540 14560 14580 14600 14620 14640 14660 14680 14700 14720 14740 14760 14780 14800 14820 14840 14860 14880 14900 14920 14940 14960 14980 15000 15020 15040 15060 15080 15100 15120 15140 15160 15180 15200 15220 15240 15260 15280 15300 15320 15340 15360 15380 15400 15420 15440 15460 15480 15500 15520 15540 15560 15580 15600 15620 15640 15660 15

[illegible]

第 6 図

10 20 30 40 50 60
 ATGCTGGAAACCAACATTTTGGCTTAGGCTGGCCGATGTGTGCAATGATGC
 MetLeuGlySerProGlnPhePheGlyLeuArgValAlaArgPheCysAlaMetAlaCys
 70 80 90 100 110 120
 TTTGGGATGGCAATTTGGCAAGTGTATATCGCAAGCTTGGCTAGGACATTT
 PheGlyPheLeuGlyThrPheAlaSerValLeuTyrLeuAlaThrPheArgTyrArgThrPhe
 130 140 150 160 170 180
 CAAMACGACACAGCTGGAGGCAATCGCTGATCGACAGCCGACCTGGCTGCTGTCTA
 GluLysGlnGlnGlnArgLeuGlnArgLileProAspProAlaLileSerProAlaCysLeu
 190 200 210 220 230 240
 ACTGATGGCCGACAGGCAATACCGGGTTATGCCGACCATCGACAGCTGTGTGGCTG
 ThrAspAlaProAlaArgLysTyrArgGlyTyrAlaProProSerAlaLeuCysGlyLeu
 250 260 270 280 290 300
 AATGGGAGCGCTGCAATTTGGCCACACAGCTTCAAGCTTGGCTGGTGTATATATCTG
 AsnArgLileArgAlaGlnPheAlaProThrLysLeuGlnAlaThrArgArgLysTyrLeu
 310 320 330 340 350 360
 CACCAATTTGGCGCTGGAGGCGGATGGCAGTCCGCCACACAGCTTGGCAGAGTCT
 PheAlaThrAlaTyrGlnLileGlyPheAlaProAlaProThrArgLeuProLileSer
 370 380 390 400 410 420
 GCGCTGTGGGACCTGGCGGCTTCAATAAATGCTATCGCGGACCATGGCTGGCTGCCA
 AlaThrCysAlaLeuProGlnTyrLileLysTyrTyrArgAlaGlnCysArgAlaLeuPro
 430 440 450 460
 CCGATGCCACAGCGCTGTGGCGGCTTGTGGCTGGCGGCTG
 AlaSerAlaLileSerAlaTyrProLeuAlaLeuArgAla

第 7 図 - 1

10 20 30 40 50 60
 ATGGCAACGATATATATCGCGCTGAAACGCAATTTTCAATACCATCTGGCGACGTC
 MetArgLysArgLileLeuAlaGlnGlyThrGlnTyrPheAspAlaLileLeuGlyGlnAla
 70 80 90 100 110 120
 GCTGGCGCTGGCTGGCGGCAATACGGCAGTTCATATTCGCTGGCTGGAGGCAACA
 AlaGlyArgAlaValGlnGlnTyrGlyLysPheAlaLileAlaLeuValGlnAlaThr
 130 140 150 160 170 180
 GGCATTACGGAGATCGCGGCAATCGCCGACATCTCTGTGGCAATTCGACGACATTC
 AlaLileThrGlnAspGlyGlyLileValProThrSerSerValGlnLysSerGlnThrPhe
 190 200 210 220 230 240
 CTCATCTGGCGGCAACGCTCATATCGAGCTAATATGATCGACGATCGATCGTGGAA
 LeuAlaLeuAlaGlnLysValLileGlnGlnAlaGlnGlnLileArgLileProLileLeuGln
 250 260 270 280 290 300
 GGCATCAATCATCTGGCAAGGCAATGTCGGCTGCTTACCGCTGATATTTGGCGG
 GlyLileLileAspLileTyrAspGlyLysValSerGlyValProThrArgLileLileValPro
 310 320 330 340 350 360
 ATTGTACGGGCAATCAAGCGGCTGGGTGGCGGCTTTTACGGGTGAAACCGGACACATTT
 LileValArgLileAspGlnArgValGlnGlyProAlaLileArgValAlaLileProLileLile
 370 380 390 400 410 420
 GCTGCCATTGTACGACGCAATACCGGACAGCAATCGCGGCTTGGCGGCGGCGGACGAA
 AlaAlaLileValArgThrAsnAspArgAspArgLileValProPheAlaLileProLileGln
 430 440 450 460 470 480
 ACACCAACGCTATTCGGGCTATTCTGTGATTTGTTGGGCTGAACTCAACACACAC
 ThrLileLysAlaLileLileGlyTyrLileLeuAspPhePheGlyLileGlnValLysGlnAla

第7図 - 2

480 500 510 520 530 540
 CATTGCGGCTCACTTCTGCGGCTCAGCTGCTGCGCAATGTCGCAAGCGCTG
 ArgLeuProSerLeuLeuProLeuSerGlyPheGlyAsnValAlaSerAlaPhe
 550 560 570 580 590 600
 CTGCAAGGCTCAAGCAAGCCGATTGCAAAATCTGTGGCTAAGTGGCTGATTGAG
 LeuGlyLeuLeuSerGlyProPheGlyLeuLeuValGlyPheSerGlyValIleGln
 610 620 630 640 650 660
 GATGGCATTTGGCATGCTGCAATTCGCGGCTATGCGATTGCTCTGCTGCTCTTTC
 AspGlyMetLeuAlaLeuAspSerGlyArgGlyIleAlaSerAlaSerSerPhe
 670 680 690 700 710 720
 TGGCTACGCGGACGCTCCGCAAGATCAATACGCGATGCAATTCCTTCGCGCAG
 SerLeuSerProGlyIleAlaGlyIleLeuAsnArgMetAspPheMetGlySerLys
 730 740 750 760 770 780
 ATCATCTCCGCGCGGATGTCGCAAGCGCGGCTATTCGCGCTTTAGCTGCTC
 IleIleLeuArgGlyIleAspValSerAsnSerProGlyIleIleGlyArgGlyGlyCys
 790 800 810 820 830 840
 ATTCCATCAACGCGCATCTCAGCGGCTATTACGCAAGCTGCAATTCATCGCGCTG
 IleIleAlaMetGlyMetIleGlyIleAlaGlyIleTyrGlyAsnValAsnSerThrArgVal
 850 860 870 880 890 900
 ATCGATTCCAAATCATGATGCTATTCGCGGATCGCGGCTATTTTCGCGGAGTTCCTAC
 MetGlySerLysMetAlaMetGlyIleGlyGlySerGlyAspPheAlaArgSerSerTyr
 910 920 930 940 950 960
 CTGTGATCTTCTGCTGCTGCTGCAAGCGGCTGCAAGCTTTCGCGCTTTCGCGG
 LeuSerIlePheLeuSerProSerThrAlaGlyGlyLysIleSerAlaIleValPro
 970 980 990 1000 1010 1020
 ATGCTGCGGCTATGTCGCGCATCTCAGCGGCTGCGGCTGCGGCTTTCGCGGAGG
 MetAlaAlaIleIlePheAlaSerPheIleIleGlyMetAlaGlyIlePheValThrGlyGlyGly

第7図 - 3

1030 1040 1050 1060 1070 1080
 CTGCGGATCTGCGTGGGCTTTCACGCGTGCAACGTCGCGGTGAATATTATTCGAAATGT
 LeuAlaAspLeuArgGlyLeuSerProValGlnArgAlaArgGlyIleIleSerLysCys
 1090 1100 1110 1120 1130 1140
 GCGCATCCGATTACCGCGGATGTTGCAAGGATTATTTGATCGTGGCTTAAAAATTCC
 AlalIleProAspTyrArgProMetLeuGlnAspTyrPheAspArgAlaLeuLysAsnSer
 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 TTTGGTAAGCACACCGCATCTGCTGACCGAAGCTCTGCTTGGCATCAGCGTTTATT
 PheGlyLysIleThrProIleLeuLeuThrGluAlaLeuSerTrpIleGlnArgPheIle
 1210 1220
 GATACGGGCAACATGCTCCCATCA
 AspThrGlyThrMetLeuProSer

特開平3-219878(12)

第1頁の続き

⑤Int. Cl. ³	識別記号	庁内整理番号
//(C 12 N 15/31		
(C 12 R 1:02)		
(C 12 N 1/21		
(C 12 R 1:02)		
(C 12 N 15/52		
C 12 R 1:02)		

手続補正書(方式)

平成 2年 5月 10日

7. 補正の対象

図面

8. 補正の内容

(1) 第4回を別紙のとおり補正する。(内容に変更なし)

特許庁長官殿

1. 事件の表示

平成 2年 特許願 第24395号

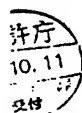
2. 発明の名称

酢酸耐性遺伝子、それを含むプラスミド及び
形質転換した酢酸菌

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人
住 所 愛知県半田市の中村町2丁目6番地
名 称 株式会社 中 塾 酢 店
代 表 者 中 塾 又 左 衛 門

4. 代 理 人

住 所 〒105東京都港区虎ノ門一丁目19番14号
邦楽ビル503
氏 名 井理士(7577) 戸 田 毅 男
電話 508-0333

5. 補正命令の日付

平成 2年 5月 22日 (発送日)

6. 補正により増加する発明の数 なし